

2-氯酚驯化对厌氧污泥微生物种群结构的影响

黄爱群¹, 戴亚蕾², 陈玲^{1*}, 陈皓¹, 张文¹

(1. 同济大学环境学院污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092; 2. 同济大学医学院免疫实验室, 上海 200092)

摘要: 用古细菌特异性引物 ARC21F/ARC958R 和酸杆菌特异性引物 31F/907R, 对 2-氯酚(2-chlorophenol, 2-CP)驯化前后厌氧颗粒污泥样品总 DNA 进行了 16S rDNA 的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、克隆、测序及序列分析, 研究了 2-CP 驯化前后厌氧颗粒污泥中微生物种群结构的变化。结果表明, 2-CP 驯化前后厌氧颗粒污泥中存在共有的古细菌菌种: *Methanotrix soehngenii*、*Methanosaeta concilii* 及 uncultured euryarchaeote 等。2-CP 驯化后的厌氧污泥中出现了特有的微生物 *Methanobacterium aarhusense*、*Methanobacterium curvum* 及 *Methanobacterium beijingense* 等, 而接种污泥中特有的一些古细菌发生了消亡。对该厌氧体系酸杆菌的分析表明, 2-CP 驯化前后的厌氧颗粒污泥中存在共有的微生物菌种: uncultured bacterium、uncultured *Acidobacterium* 和 unknown *Actinomyce* (MC 9)。经 2-CP 驯化后, 接种污泥中特有的微生物 *Desulfotomaculum* sp. 176、uncultured *Deltaproteobacterium* n8d 及 uncultured hydrocarbon seep bacterium 等发生消亡, 并出现了特有的微生物 uncultured *Holophaga/Acidobacterium*、uncultured *Acidobacteria* bacterium 及 unidentified *Acidobacterium*。

关键词: 2-氯酚; 厌氧颗粒污泥; 驯化; 古细菌; 酸杆菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)03-0781-07

Effects of 2-chlorophenol-acclimation on Microbial Community Structure in Anaerobic Granular Sludge

HUANG Ai-qun¹, DAI Ya-lei², CHEN Ling¹, CHEN Hao¹, ZHANG Wen¹

(1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Department of Immunology, School of Basic Medical Science, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: The microbial community structure in 2-chlorophenol-acclimated anaerobic granular sludge and inoculating sludge were analyzed by 16S rDNA-based approach. Total DNA was extracted directly from the inoculating sludge and 2-CP-acclimated anaerobic sludge, and then amplified by polymerase chain reaction (PCR) technique with the specific primer pair ARC21F/ARC958R for *Archaea* and 31F/907R for *Acidobacteria* respectively. The positive PCR products were cloned and sequenced. The sequences analysis shows that there exist common *Archaea* in both sludge, including *Methanotrix soehngenii*, *Methanosaeta concilii* and uncultured euryarchaeote etc. Some special *Archaea* appear in the 2-CP-acclimated sludge, such as *Methanobacterium aarhusense*, *Methanobacterium curvum* and *Methanobacterium beijingense* etc. Others originally existed in the inoculating sludge disappear after acclimation. Common *Acidobacteria* are found in both sludge, including uncultured bacterium, uncultured *Acidobacterium* and unknown *Actinomyce* (MC 9). Some special microbes originally existed in the inoculating sludge, such as *Desulfotomaculum* sp. 176, uncultured *Deltaproteobacterium* n8d and uncultured hydrocarbon seep bacterium etc. disappear after acclimation, and uncultured *Holophaga/Acidobacterium*, uncultured *Acidobacteria* bacterium and unidentified *Acidobacterium* are found after 2-CP-acclimation.

Key words: 2-CP; anaerobic granular sludge; acclimation; *Archaea*; *Acidobacteria*

氯代酚类作为重要的工业原料被广泛使用, 因其有毒难降解性对环境造成的污染面广、影响大, 美国环保局(EPA)和我国均将氯酚类物质列为优先控制污染物。与传统的物理法、化学法以及好氧生物处理技术相比, 厌氧颗粒污泥的微生物还原脱氯作用是降解氯酚类物质的有效途径。厌氧消化是多种微生物共同作用的过程^[1,2], 而产酸菌和产甲烷菌在厌氧反应器的运行中具有重要作用, 因此研究其种群结构分布以了解这些微生物类群的生态, 对厌氧处理系统的有效运行、提高有机物的厌氧降解效率具有重要意义^[3]。

由于传统研究方法的局限性^[4,5], 产甲烷菌的代谢作用还没有象其他类群的细菌那样被广泛研究^[6,7], 酸杆菌的确切功能和生态特性目前仍不是很明确^[8]。近年来, 基于 16S rDNA 克隆技术鉴别微生物组成的方法已广泛应用于各种环境样品^[9~12], 这些方法无需分离培养就可以反映微生物的群落结构信息。

收稿日期: 2007-04-06; 修订日期: 2007-05-22

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(20025AA601270)

作者简介: 黄爱群(1980~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为污水厌氧处理, E-mail: huangaiqun2033@sina.com

* 通讯联系人, E-mail: chenling@mail.tongji.edu.cn

本研究使用基于 16S rDNA 的克隆技术,从厌氧颗粒污泥直接提取总 DNA,用古细菌和酸杆菌特异性引物进行 PCR 扩增、克隆、测序及序列分析等,以考察经 2-CP 驯化前后厌氧颗粒污泥中古细菌和酸杆菌的种群结构变化,以期为在分子生物学水平上阐明降解 2-CP 厌氧污泥颗粒的微生物种群信息、提高有机物的厌氧降解效率提供一定的理论依据.

1 材料与方法

1.1 降解 2-CP 的厌氧颗粒污泥的驯化及样品采集

接种污泥选用无锡罗氏柠檬酸厂 IC 厌氧反应器污泥.反应器内径 50 mm,外径 80 mm,总高度 400 mm,有效容积 0.75 L.用葡萄糖和 2-CP 共同驯化,进水 COD 控制在 2 000 mg/L 左右,并按比例加入所需的营养盐.水力停留时间(HRT)控制在 12 h 左右,pH 为 7.5~8.0,温度为 37℃±1℃.当进水 2-CP 浓度达到 25 mg/L, COD 和 2-CP 的去除率>90%时说明驯化成功^[13]. COD 的测定采用国家标准法

(GB 11914-89)^[14], MLSS 和 MLVSS 的测定采用重量法^[15], 2-CP 测定用高效液相色谱(HPLC)法^[13].

1.2 总 DNA 的提取

取接种污泥及厌氧反应器内经 2-CP 驯化稳定后的污泥各 200 mg,用蒸馏水冲洗 3 遍,5 000 r/min 离心 2 min 弃去上清,用蛋白酶 K、氯仿/异戊醇方法直接抽提污泥样品的总 DNA^[16],提取的总 DNA 中用 100 μL 无菌超纯水溶解,加入 RNAase(终浓度 100 μg/mL),37℃温育 30 min.总 DNA 片段的大小和质量用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳(DYB- I 型电泳仪)检验,用紫外分光光度计(BioPhotometer, Eppendorf 公司)测定浓度为 150 μg/mL.

1.3 16S rDNA 的 PCR 扩增及纯化

为考察厌氧颗粒污泥中古细菌和酸杆菌在 2-CP 驯化前后的分布情况,使用古细菌特异性引物和酸杆菌特异性引物扩增 16S rDNA,引物由 Invitrogen 生物技术有限公司合成,具体信息见表 1.

PCR 反应在 Mastercycler Gradient (Eppendorf

表 1 PCR 扩增中使用的古细菌引物和酸杆菌引物

Table 1 Primers used in PCR experiments				
引物	序列 (5'-3')	特异性	<i>E. coli</i> 编号	文献
ARC21F	TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA	<i>Archaea</i>	2~21	[17]
ARC958R	YCC GGC GTT GAM TCC AAT T	<i>Archaea</i>	940~958	[17]
31F	GAT CCT GGC TCA GAA TC	Kingdom <i>Acidobacteria</i>	15~31	[18]
907R	CCC CGT CAA TTC ATT TGA GIT T	Universal	907~928	[19]

公司)上进行,50 μL 的反应体系为:10×PCR 反应缓冲液 5 μL,10 mmol/L 的 dNTP 溶液 1 μL,10 mmol/L 的引物对各 1 μL, *Taq* 酶 2 个单位,样品 DNA 溶液 2 μL,加无菌双蒸水补足至 50 μL.

古细菌的 PCR 扩增程序为:94℃预变性 2 min;94℃,45 s,51℃,60 s,72℃,90 s,30 个循环;72℃,10 min.酸杆菌的 PCR 扩增程序为:94℃预变性 2 min;94℃,45 s,60℃,45 s,72℃,90 s,30 个循环;72℃,10 min.PCR 产物经 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检验后,割下目标片段大小的条带,用胶纯化回收试剂盒进行回收和纯化(Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System, Promega 公司),用紫外分光光度计测定纯化后的 PCR 产物浓度.

1.4 克隆和测序

按操作说明,将纯化后的 DNA 片段克隆至 pMD19-T Vector(Takara 公司)上,取适量转化菌液涂布在选择性 LB 琼脂平板上,37℃培养过夜(18 h)以筛选含重组质粒的白色克隆子.为进一步验证筛选出的白色克隆子是否为阳性,挑取白色菌斑于 94℃

煮沸 2 min 以获得质粒 DNA,分别用古细菌和酸杆菌引物,按照 1.3 节中的条件做 PCR(25 μL 反应体系),产物用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳验证.把经 2 次 PCR 验证并确定含目标 DNA 片段的白色克隆子接种于 2 mL 的 LB 母液(含 50 μg/mL 氨苄青霉素)中,180~220 r/min 摇床振荡培养过夜(37℃,18 h),培养后的菌液送上海生工生物技术有限公司测序.

用 BLAST 程序将测序结果与 NCBI(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)核酸数据库中已公布的序列进行比较,采用 Vector NTI 软件分析不同菌种片段的同源性,绘制系统发育树并分析基因的系统发育关系.

2 结果与讨论

2.1 降解 2-CP 厌氧颗粒污泥的驯化^[13]

污泥的驯化过程中逐步提高进水中 2-CP 的浓度,使微生物逐渐适应 2-CP 的毒性并具有降解 2-CP 的能力.从图 1 可以看出,驯化初期污泥对 2-CP 的降解能力有限,虽然进水中 2-CP 浓度很低,但出水

中仍然有 2-CP 检出.从第 10 d 以后,随着驯化过程的进行微生物对 2-CP 的耐受性逐渐增强,具有 2-CP 降解能力的微生物逐渐繁殖增长,使得污泥降解 2-CP 的能力逐步提高.在本研究的驯化过程中,COD 的去除率基本稳定在 85%~95%,当 2-CP 的去除率 >90% 时说明驯化成功,驯化过程约 60 d.

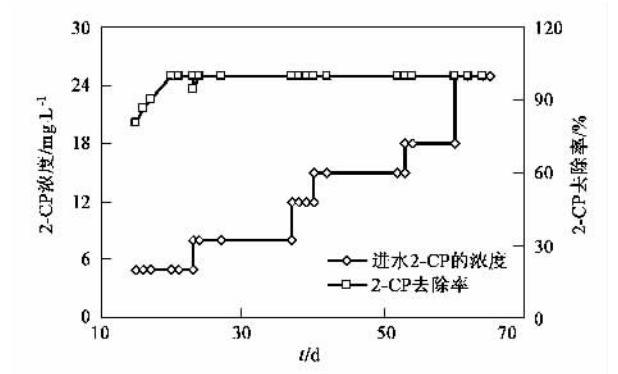


图 1 驯化阶段2-CP的去除情况

Fig.1 Degradation efficiency of 2-CP during acclimation

2.2 16S rDNA 的 PCR 扩增、克隆和测序

提取的总 DNA 大小约为 23k bp,用古细菌特异性引物和酸杆菌特异性引物进行 PCR 扩增,分别得到大小约为 930 bp 和 870 bp 的 DNA 片段.

2.2.1 2-CP驯化前后古细菌的多样性分析

取接种污泥和2-CP驯化后的污泥样品用古细菌特异性引物进行 PCR 扩增、克隆以及再次验证后,各挑取 33 个阳性克隆子的菌液去测序.测序结果与 NCBI 的核酸数据库已有的基因序列进行比对,结果如表 2 和表 3 所示,2-CP驯化后厌氧颗粒污泥古细菌的系统发育关系如图 2 所示.分析表明,2-CP驯化前后厌氧颗粒污泥中存在 7 个共有的古细菌菌种(见表 2): *Methanothrix soehngenii*、*Methanosaeta concilii*、uncultured euryarchaeote 及 uncultured archaeon 等,并且 *Methanothrix soehngenii* 在污泥微生物中的

丰度由驯化前的 45% 提高到了驯化后的 93.9%, uncultured archaeon TA05、uncultured archaeon TA04 和 uncultured archaeon TA01 在污泥微生物中的丰度分别由驯化前的 50%、45%和 45%提高到了驯化后的 93.9%、90.9%和 57.6%.与驯化前相比,经2-CP驯化后的厌氧污泥中出现了一些特有的古细菌菌种(见表 3),如 uncultured *Methanomicrobiaceae*、*Methanobacterium* sp. SA-12、*Methanobacterium aarhusense*、*Methanobacterium curvum* 及 *Methanobacterium beijngense* 等,而接种污泥中特有的一些古细菌菌种发生了消亡,如 uncultured archaeon GA55、uncultured archaeon ZAR123 及 uncultured archaeon isolate MUAHR 等.厌氧颗粒污泥在经过 2-CP驯化后,检出的古细菌菌种由驯化前的 18 个增加到 23 个,其中增加了 16 个新的古细菌菌种,而接种污泥中原有的 11 个古细菌菌种在驯化后消亡.这说明2-CP的驯化造成了厌氧颗粒污泥中古细菌群落结构的变化,能适应或能降解2-CP的古细菌经过驯化后得到加强,不能适应的古细菌种群则被削弱甚至消亡,使得古细菌种群分布更为丰富,以适应新的厌氧体系.

据资料报道,在 UASB 等厌氧反应器中甲烷菌的优势菌多为 *Methanosaeta concilii* 和 *Methanothrix soehngenii*,本研究的结果与之相符^[20~22].McHugh 等^[23]对低温(10℃~14℃)、中温(37℃)和高温(55℃)下的厌氧颗粒污泥反应器中甲烷菌种群结构进行分析,确定这些厌氧反应器中优势菌种为 *Methanosaeta*(甲烷毛状菌属),并在低温厌氧反应器中发现了新的微生物.Godon 等^[24]对处理酿酒废水的流化床反应器中包括真细菌、古细菌、原核生物、真核生物等的微群落结构进行分析,确定该反应器中 95%的古细菌种群属于 *Methanosarcina*(甲烷八叠球菌属)和 *Methanobacteriaceae*(甲烷杆菌科).

表 2 2-CP驯化前后厌氧污泥中共有古细菌的序列相似性分析结果

Table 2 Closest phylogenetic group of common Archaea in inoculating sludge and 2-CP-acclimated sludge					
共有的古细菌种群	2-CP驯化前丰度/%	2-CP驯化后丰度/%	GenBank 中最相近的微生物种	Accession Number	序列相似性/%
<i>Methanothrix soehngenii</i>	45	93.9	<i>Methanothrix soehngenii</i> DNA for a 16S rRNA gene cluster	X51423.1	99
<i>Methanothrix soehngenii</i>	45	93.9	<i>Methanothrix soehngenii</i> gene for 16S rRNA	X16932.1	99
<i>Methanosaeta concilii</i>	5	6.1	<i>Methanosaeta concilii</i> 16S rRNA	M59146.1	98
uncultured archaeon	50	93.9	uncultured archaeon TA05 16S rRNA gene	AF229778.1	99
uncultured archaeon	45	90.9	uncultured archaeon TA04 16S rRNA gene	AF229777.1	98
uncultured archaeon	45	57.6	uncultured archaeon TA01 16S rRNA gene	AF229774.1	99
uncultured euryarchaeote	35	39.4	uncultured euryarchaeote EHB109 16S rRNA gene	AF374281.1	98

表 3 2-CP驯化前后厌氧污泥中特有古细菌的序列相似性分析结果

Table 3 Closest phylogenetic group of special *Archaea* in inoculating sludge and 2-CP-acclimated sludge

项目	来源	丰度/%	GenBank 中最相近的微生物种	Accession Number	序列相似性/%
驯化前特有的古细菌种群	uncultured archaeon	50	uncultured archaeon 44A-116S rRNA gene	AF424765.1	99
	uncultured archaeon	50	uncultured archaeon 39-2 16S rRNA gene	AF424769.1	99
	uncultured archaeon	50	uncultured archaeon 46-1 16S rRNA gene	AF424764.1	99
	uncultured archaeon	45	uncultured archaeon 69-1 16S rRNA gene	AF424763.1	97
	uncultured archaeon	5	uncultured archaeon ZAR123 16S rRNA gene	AY341319.1	
	uncultured archaeon	5	uncultured archaeon isolate MUAHR 2 16S rRNA gene	AF376789.1	98
	uncultured archaeon	5	uncultured archaeon GA55 gene for 16S rRNA	AB046184.1	95
	uncultured archaeon	5	uncultured archaeon GA32 gene for 16S rRNA	AB046181.1	94
	uncultured archaeon	5	uncultured archaeon isolate MUAHR 1 16S rRNA gene	AF376788.1	99
	uncultured archaeon	5	uncultured archaeon ASDS1 16S rRNA gene	AY032982.1	99
驯化后特有的古细菌种群	uncultured archaeon	5	uncultured archaeon ASDS2 16S rRNA gene	AY032983.1	99
	uncultured archaeon	3.0	uncultured archaeon TA02 16S rRNA gene	AF229775.1	99
	uncultured archaeon	3.0	uncultured archaeon gene for 16S rRNA	AB195849.1	99
	uncultured archaeon	3.0	uncultured archaeon gene for 16S rRNA	AB195851.1	99
	uncultured archaeon	3.0	uncultured archaeon gene for 16S rRNA	AB195850.1	98
	uncultured archaeon	3.0	uncultured archaeon Arc. No. 20 16S rRNA gene	AF395425.1	97
	uncultured archaeon	3.0	uncultured archaeon WCHD3-07 16S rRNA gene	AF050617.1	93
	uncultured <i>Methanomicrobiaceae</i> archaeon	3.0	uncultured <i>Methanomicrobiaceae</i> archaeon MRR49 small subunit rRNA gene	AY125724.1	96
	<i>Methanobacterium</i>	3.0	<i>Methanobacterium</i> sp. SA-12 16S rRNA gene	AY695843.1	96
	<i>Methanobacterium</i>	3.0	<i>Methanobacterium aarhusense</i> strain 5-4 16S rRNA gene	DQ649334.1	95
	<i>Methanobacterium</i>	3.0	<i>Methanobacterium curvum</i> 16S rRNA gene	AF276958.1	95
	<i>Methanobacterium</i>	3.0	<i>Methanobacterium oryzae</i> 16S rRNA	AF028690.2	94
	<i>Methanobacterium</i>	3.0	<i>Methanobacterium aarhusense</i> 16S rRNA gene	AY386124.1	96
	<i>Methanobacterium</i>	3.0	<i>Methanobacterium congolense</i> 16S rRNA gene	AF233586.1	94
	<i>Methanobacterium beijingense</i>	3.0	<i>Methanobacterium beijingense</i> strain 4-1 16S rRNA gene	AY552778.1	99
	<i>Methanobacterium beijingense</i>	3.0	<i>Methanobacterium beijingense</i> strain 8-2 16S rRNA gene	AY350742.1	99
	Methanogenic archaeon	3.0	Methanogenic archaeon NOBI-1 gene for 16S rRNA	AB162774.1	97

2.2.2.2 2-CP驯化前后酸杆菌的多样性分析

酸杆菌在环境中分布广泛、形态表现丰富多样，在土壤、温泉及海水等许多生态系统中都曾检测到酸杆菌的存在^[8]。土壤中超过 30% 甚至 50% 的 16S rDNA 克隆文库中的序列都属于酸杆菌，纯培养的酸杆菌只有很少一部分，除 *Acidobacterium capsulatum*、*Holophaga foetida* 及 *Geothrix fermentans* 3 个可培养的属之外，关于酸杆菌的种群信息大部分是未知的^[25,26]，据报道酸杆菌可能属于甲醇代谢类细菌^[27]。

取接种污泥和 2-CP 驯化成功后的污泥样品用酸杆菌特异性引物进行 PCR 扩增、克隆以及再次验证后，各挑取 30 个阳性克隆子的菌液去测序。测序结果与 NCBI 核酸数据库已有的基因序列比对，结果如表 4 和表 5 所示，2-CP 驯化后厌氧颗粒污泥酸杆菌的系统发育关系如图 3 所示。对该厌氧体系酸杆菌的分析结果表明，2-CP 驯化前后的厌氧颗粒污泥中存在共有的微生物菌种（见表 4）：uncultured bacterium、uncultured *Acidobacterium* 和 unknown

Actinomycete（MC 9）。其中，uncultured *Acidobacterium* group bacterium YNPRH5A 和 uncultured bacterium SHA-18 在厌氧颗粒污泥中的丰度分别由驯化前的 80% 和 93.3% 下降到 62.1% 和 58.6%，而 uncultured bacterium isolate ALT40 和 unknown *Actinomycete*（MC 9）均由驯化前的 3.3% 提高到了 27.6% 和 6.9%。如表 5 所示，2-CP 驯化后，原接种污泥中特有的微生物 *Desulfotomaculum* sp. 176、uncultured *Deltaproteo-bacterium* n8d 及 uncultured hydrocarbon seep bacterium 等发生消亡，并出现了特有的微生物 uncultured *Holophaga/ Acidobacterium*、uncultured *Acidobacteria* bacterium 以及 unidentified *Acidobacterium*。厌氧颗粒污泥经过 2-CP 的驯化后能重新调整原有的酸杆菌种群结构，在产生新种群的同时，部分旧种群被削弱或消亡以适应环境的变化。

本研究用酸杆菌特异性引物进行 PCR 扩增，测得序列与 GenBank 中已有基因序列进行比对后，发现与 unknown *Actinomycete*（放线菌）、*Desulfotomaculum* sp.（厚壁菌门的脱硫肠状菌）及 uncultured

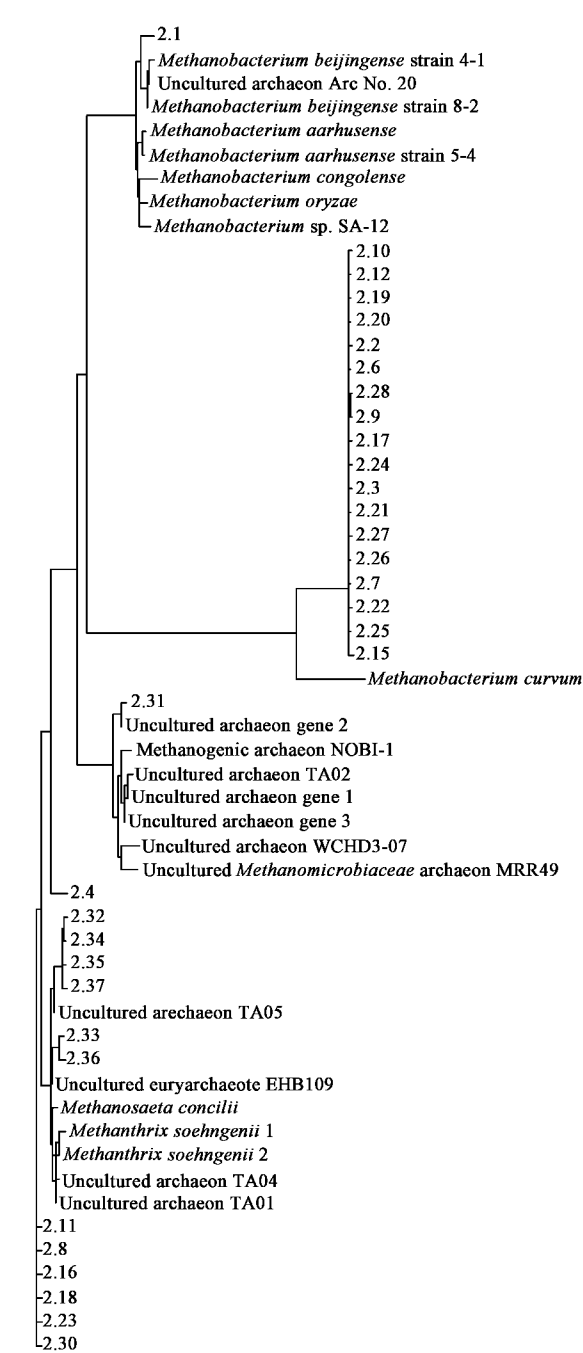


图 2 基于 16S rDNA 序列同源性的降解2-CP厌氧颗粒污泥中的古细菌系统发育树

Fig.2 Archaea phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of anaerobic granular sludge for 2-CP-degradation

Deltaproteobacterium (变形杆菌门的 δ -变形杆菌属) 有较高的相似性 (见表 4 和表 5). Sait 等^[28] 对土壤酸杆菌进行了研究, 在 125 个克隆子中发现有 4 个克隆子所代表的微生物不属于酸杆菌, 它们分别是 *Actinobacteridae* (放线菌门的放线菌纲)、*Alphaproteobacteria* (变形杆菌门的 α -变形杆菌纲) 和

Betaproteobacteria (变形杆菌门的 β -变形杆菌纲) 以及 *Sphingobacteria* (拟杆菌门的鞘脂杆菌纲). 基于 16S rDNA 的系统发育关系, 有资料报道酸杆菌和变形杆菌具有近缘关系^[25, 29, 30]. Quaiser 等^[26] 认为 *Acidobacteria* (酸杆菌门)、*Proteobacteria* (变形杆菌门) 和 *Firmicutes* (厚壁菌门) 的嘌呤操纵子结构相似, 是因为它们起源于三者共同的祖先. 本研究中测得的序列与 GeneBank 中已有基因序列的相似性在较低的范围, 有可能代表一些新的酸杆菌, 有待进一步研究.

利用基于 16S rDNA 的克隆方法无需分离培养就可以反映微生物的群落结构信息. 本研究曾尝试利用单酶切和双酶切获得目标 DNA 片段, 多次酶切失败后发现, 很多酶的酶切位点与细菌 PCR 扩增所用引物序列重合, 因此酶切后无法得到目标 DNA 片

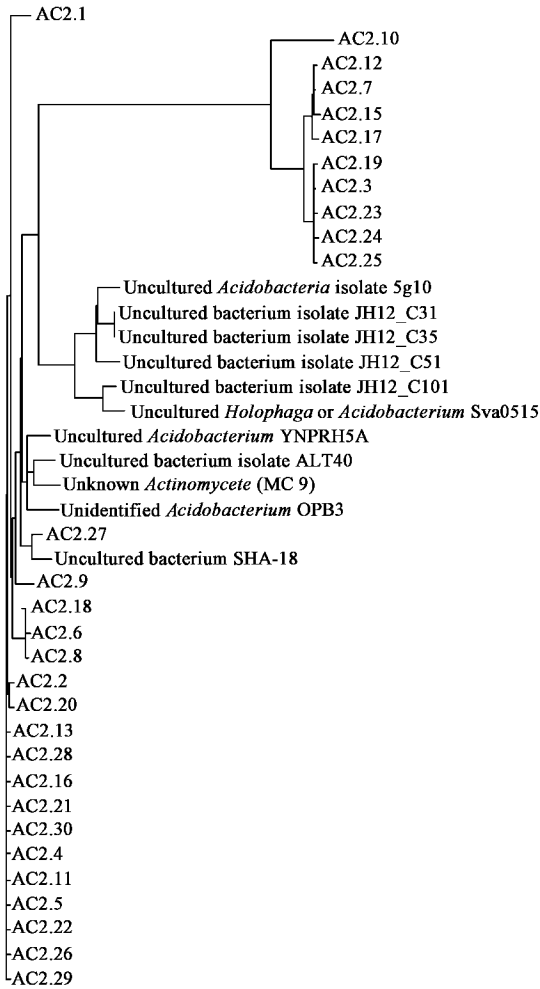


图 3 基于 16S rDNA 序列同源性的降解2-CP厌氧颗粒污泥中的酸杆菌系统发育树

Fig.3 Acidobacteria phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of anaerobic granular sludge for 2-CP-degradation

表 4 2-CP驯化前后厌氧污泥中共有的酸杆菌的序列相似性分析结果

Table 4 Closest phylogenetic group of common <i>Acidobacteria</i> in inoculating sludge and 2-CP-acclimated sludge					
共有的种群	2-CP驯化 前丰度/%	2-CP驯化 后丰度/%	GenBank 中最相近的微生物种	Accession Number	序列相 似性/%
uncultured <i>Acidobacterium</i> bacterium	80	62.1	uncultured <i>Acidobacterium</i> group bacterium YNPRH5A 16S rRNA gene	AF465658.1	94
uncultured bacterium	93.3	58.6	uncultured bacterium SHA-18 16S rRNA gene	AJ249099.1	93
uncultured bacterium	3.3	27.6	uncultured bacterium isolate ALT40 16S rRNA gene	AY703464.1	92
<i>Actinomyce</i> te	3.3	6.9	unknown <i>Actinomyce</i> te (MC 9) 16S rRNA	X68467.1	92

表 5 2-CP驯化前后厌氧污泥中特有的酸杆菌的序列相似性分析结果

Table 5 Closest phylogenetic group of special <i>Acidobacteria</i> in inoculating sludge and 2-CP-acclimated sludge					
项目	来源	丰度/%	GenBank 中最相近的微生物种	Accession Number	序列相似性/%
驯 化 前 特 有 的 酸 杆 菌	<i>Actinomyce</i> te	6.7	unknown <i>Actinomyce</i> te (MC 26) 16S rRNA	X68468.1	91
	uncultured bacterium	3.3	uncultured bacterium isolate JH12_ C17 16S rRNA gene	AY568858.1	91
	uncultured bacterium	3.3	uncultured bacterium isolate JH12_ C58 16S rRNA gene	AY568897.1	90
	uncultured bacterium	3.3	uncultured bacterium isolate JH12_ C33 16S rRNA gene	AY568874.1	89
	uncultured vent bacterium	3.3	uncultured vent bacterium ML-6 16S rRNA gene	AF209002.1	89
	uncultured hydrocarbon seep bacterium BPC102	3.3	uncultured hydrocarbon seep bacterium BPC102 16S rRNA gene	AF154083.1	89
	uncultured <i>Deltaproteobacterium</i>	3.3	uncultured <i>Deltaproteobacterium</i> n8d 16S rRNA gene	AF194202.1	87
	<i>Desulfotomaculum</i> sp.176	3.3	<i>Desulfotomaculum</i> sp. 176 16S rRNA gene	AF295657.1	89
驯 化 后 特 有 的 酸 杆 菌	uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium	3.4	uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium isolate 5g10 16S rRNA gene	AY177760.1	94
	uncultured bacterium	3.4	uncultured bacterium isolate JH12_ C51 16S rRNA gene	AY568890.1	94
	uncultured bacterium	3.4	uncultured bacterium isolate JH12_ C35 16S rRNA gene	AY568876.1	94
	uncultured bacterium	3.4	uncultured bacterium isolate JH12_ C31 16S rRNA gene	AY568872.1	94
	uncultured bacterium	3.4	uncultured bacterium isolate JH12_ C101 16S rRNA gene	AY568933.1	88
	uncultured <i>Holophaga</i> / <i>Acidobacterium</i>	3.4	uncultured <i>Holophaga</i> / <i>Acidobacterium</i> Sva0515 16S rRNA gene	AJ241004.1	88
	unidentified <i>Acidobacterium</i>	3.4	unidentified <i>Acidobacterium</i> group OPB3 16S rRNA gene	AF027004.1	92

段.于是直接把目标 DNA 片段克隆到 T-vector,结果证明这种方法是可行的.

3 结论

(1)2-CP驯化前后厌氧颗粒污泥中存在共有的古细菌菌种: *Methanothrix soehngenii*、*Methanosaeta concilii* 及 uncultured euryarchaeote 等.与驯化前相比,经2-CP驯化后的厌氧污泥中出现了一些新的微生物,如 *Methanobacterium aarhusense*、*Methanobacterium beijingense* 及 *Methanobacterium curvum* 等,而接种污泥中特有的一些古细菌发生了消亡.

(2)2-CP驯化前后的厌氧颗粒污泥中存在共有的微生物菌种: uncultured bacterium、uncultured *Acidobacterium* 和 unknown *Actinomyce*te (MC 9).经2-CP驯化后,接种污泥中特有的微生物 *Desulfotomaculum* sp.176、uncultured *Deltaproteobacterium* n8d 及 uncultured hydrocarbon seep bacterium 等发生消亡,并出现了新的微生物 uncultured *Holophaga*/*Acidobacterium*、uncultured *Acidobacteria* bacterium 及 unidentified *Acidobacterium* .

(3)2-CP的驯化造成了厌氧颗粒污泥中微生物种群的变化,能适应或能降解2-CP的古细菌和酸杆菌经过驯化后得到加强,而不能适应2-CP的微生物种群被削弱,同时伴随着新种群的出现和旧种群的消亡.

参考文献:

[1] Chynoweth D P, Pullammanappallil P. Anaerobic digestion of municipal solid wastes [A]. In: Palmisano A C, Barlaz M A, Eds. Microbiology of solid waste [C]. Boca Raton, F L: C R C Press, 1996. 71-113.

[2] Zinder S H, Cardwell S C, Anguish T, et al. Methanogenesis in a thermophilic (58 deg. C) anaerobic digester: *Methanothrix* sp. As an important acetilastic methanogen [J]. Appl Environ Microbiol, 1984, 47: 796-807.

[3] Griffin M E, McMahon K D, Makic R I, et al. Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids [J]. Biotechnol Bioeng, 1998, 57(3): 342-355.

[4] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial population by DGGE analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695-700.

- [5] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiol Rev, 1995, **59**(1):143-169.
- [6] Raskin L, Poulsen L K, Noguera D R, *et al.* Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, **60**(4):1241-1248.
- [7] Raskin L, Stomley J M, Rittmann B E, *et al.* Group-species 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, **60**(4):1232-1240.
- [8] Ludwig W, Bauer S H, Bauer M, *et al.* Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum [J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, **153**(1):181-190.
- [9] Acinas S G, Antón J, Rodríguez-Valera F. Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, **65**(2):514-522.
- [10] Sekiguchi Y, Kamagata Y, Syutsubo K, *et al.* Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis [J]. Microbiol, 1998, **144**(9):2655-2665.
- [11] 张春杨, 刘晓黎, 东秀珠. 豆腐废水 UASB 反应器中的原核生物多样性及主要功能菌群[J]. 微生物学报, 2004, **44**(2):141-147.
- [12] Snaird J, Amann R I, Huber I, *et al.* Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, **63**(7):2884-2896.
- [13] 陈皓. 几种典型重金属离子对 2-氯酚厌氧降解的影响研究[D]. 上海: 同济大学, 2005.
- [14] 国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测与分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002. 210-213.
- [15] 任南琪, 王爱杰. 厌氧生物技术原理与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004. 329-330.
- [16] 黄爱群, 傅以钢, 陈皓, 等. 降解 2-氯酚厌氧颗粒污泥中微生物种群结构研究[J]. 同济大学学报(自然科学版), 2006, **34**(12):1651-1656.
- [17] DeLong E F. Archaea in coastal marine environments [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, **89**(12):5685-5689.
- [18] Barns S M, Takala S L, Kuske C R. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, **65**(4):1731-1737.
- [19] Amann R I, Stromley J, Devereux R, *et al.* Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms [J]. Appl Environ Microbiol, 1992, **58**(2):614-623.
- [20] Delbes C, Leclerc M, Zumstein E, *et al.* A molecular method to study population and activity dynamics in anaerobic digesters [J]. Wat Sci Technol, 2001, **43**(1):51-57.
- [21] 徐向阳, 冯孝善. 五氯酚(PCP) 污染土壤厌氧生物修复技术的初步研究[J]. 应用生态学报, 2001, **12**(3):439-442.
- [22] 任艳红, 徐向阳, 唐全. 降解五氯酚厌氧生物反应器微生物种群结构的分子特性研究[J]. 环境科学学报, 2005, **25**(2):214-219.
- [23] McHugh S, Carton M, Mahony T, *et al.* Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors [J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, **219**(2):297-304.
- [24] Godon J J, Zumstein E, Dabert P, *et al.* Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, **63**(7):2802-2813.
- [25] Hugenholtz P, Goebel B M, Pace N R. Minireview: Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity [J]. J Bacteriol, 1998, **180**(18):4765-4774.
- [26] Quaiser A, Ochsenreiter T, Lanz C, *et al.* Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics [J]. Mol Microbiol, 2003, **50**(2):563-575.
- [27] Radajewski S, Webster G, Reay D S, *et al.* Identification of active methylophilic populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing [J]. Microbiol, 2002, **148**:2331-2342.
- [28] Sait M, Davis K E R, Janssen P H. Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum *Acidobacteria* occurring in soil [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, **72**(3):1852-1857.
- [29] Kuske C R, Barns S M, Busch J D. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, **63**(9):3614-3621.
- [30] Smit E, Leeflang P, Gommans S, *et al.* Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, **67**(5):2284-2291.